登革Ⅱ型病毒在白纹伊蚊体内分布的研究

谢 超，赵彤言*，杨发青，陆宝麟
（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071）

摘要：利用蚊虫连续石蜡切片免疫组织化学技术，对登革Ⅱ型病毒（DEN-2）感染白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 后的散播时间、程度及组织器官的感染顺序进行监测，以了解 DEN-2 在媒介白纹伊蚊体内的分布规律。结果表明：大剂量感染登革Ⅱ型病毒后，在蚊虫消化道的主要部位以及大多数组织器官包括神经及内分泌系统在内，如涎腺、脑、神经节等亦检测到病毒抗原。登革Ⅱ型病毒一旦感染并逸出中肠会迅速侵染其它组织。从各组织感染率的高低推断，病毒逸出中肠后通过血淋巴传播到其它组织的顺序通常为：前肠、涎腺、咽部神经节、脑及食管下神经节、后肠及复眼的小眼等。

关键词：白纹伊蚊；登革Ⅱ型病毒；免疫组织化学
中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）01-0018-06

An immunocytochemical study on the distribution of dengue 2 virus in *Aedes albopictus*

XIE Chao，ZHAO Tong-Yan*，YANG Fa-Qing，LU Bao-Lin（Institute of Microbiology and Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing 100071，China）

Abstract: Dissemination of dengue 2 virus in the female adult of *Aedes albopictus* was studied immunocytochemically to investigate the distribution of dengue 2 virus in *Ae. albopictus*. The results showed that after the mosquito was infected with high-titer virus，viral antigen was detected in entire alimentary canal，especially in the midgut regions. The antigen was also detected in other tissues，including nervous and endocrine systems，such as salivary glands，brain，ganglions，etc. Sporadic viral antigen was also found in the ovarian tissues like ovarian follicle and calyces. It was inferred that once dengue 2 virus escaped from the midgut epithelium，it could quickly spread to other tissues. The most possible sequence of the virus spreading among the infected tissues was as follows: midgut，forgut，salivary glands，brain and suboesophageal ganglions，thoracic ganglions，hindgut，compound eyes and Johnston's organ.

Key words: *Aedes albopictus*；dengue 2 virus；immunocytochemistry

关于登革Ⅱ型病毒（dengue 2 virus，DEN-2）感染白纹伊蚊后在蚊体内的分布情况，已利用解剖器官的免疫荧光检测（Kuberski，1979）、透射电镜观察（Sriurairatna and Bhamarapravati，1977）等技术进行过研究。近来一些文献强调了通过多种方法进行病毒定位研究的重要性（Hardy *et al*.，1983；Hardy，1988；Grimstad，1983）。对整个蚊虫的病毒分布研究，目前最理想的方法是进行整个蚊虫的连续石蜡切片并结合免疫酶染色等方法，以检测蚊虫切片中的病毒抗原分布（Faran *et al*.，1987）。为此，本试验应用原位组织免疫酶染色法，大剂量感染 DEN-2 后，首次对病毒在白纹伊蚊体内的分布进行了详细研究，目的是监测蚊虫吸血后病毒散播的时间、程度及组织器官的感染顺序，以了解 DEN-2 在媒介白纹伊蚊体内的分布规律。

1 材料与方法

1.1 材料

白纹伊蚊：本所养殖的广州株，3～6 日龄成蚊。在 25±10℃、相对湿度（80±5）%、光照 14 h/天的养蚊室饲养。

基金项目：总后“九五”医学杰出中青年基金课题
第一作者简介：谢超，女，1970 年 11 月 18 日生，汉族，山东泰安人，博士，助理研究员，现从事干细胞方面的博士后研究，E-mail: yuner5426@sina.com
*通讯作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2000-10-20；接受日期 Accepted：2001-06-10

病毒：登革Ⅱ型病毒，New Guinea B 株，鼠脑传代，液氮冻存。

Paraplast（包埋剂）和 Hemo-de（透明剂）均购自 Fisher 公司；碱磷酶二抗和 AP-Red 底物（中山生物技术公司）；抗 DEN-2 小鼠腹水多抗（自制）；抗登革病毒 4 个型病毒单抗 HB-114（购自 ATCC）。

1.2　方法

1.2.1　人工感染蚊虫试验：取 3～6 日龄白纹伊蚊，饥饿 18～24 h；吸取人工感染鼠脑病毒悬液，病毒滴度为 $10^{8.9}$～$10^{10.5}$ $TCID_{50}$；吸血 1 h，置 4℃冷冻 5 min 后立即挑饱血蚊，饲喂糖水，29±1℃饲喂 14 天。

1.2.2　标本取材与固定：蚊虫吸食含病毒鼠脑悬液后，分别于 2、3、5、7、9、14 天收集蚊虫标本。各取 80～100 只活蚊 4℃冷冻 5 min，去其足、翅，置于酒精布安氏液中固定，60～65℃固定 10 min，继续于室温固定 24 h；或于负压条件下固定 1 h，继续于室温固定 12～24 h。用 70%酒精洗 2～3 次，洗去固定液，并保存于 70%酒精中备用。其他的蚊虫在接种后 14 天取样，作为阳性对照；另约 150 只成蚊吸食未感染病毒的鼠脑悬液，饲养 14 天，作为对照。

1.2.3　脱水、浸蜡与包埋：已固定好的蚊虫于 70%、95%、100%Ⅰ、100%Ⅱ、100%Ⅲ 梯度酒精中各脱水 1 h，用 Hemo-de 透明，更换两次透明剂，各透明 30 min，然后按以下流程浸蜡包埋：Hemo-de∶Paraplast（1∶1）混合液 30 min→Paraplast 浸蜡 1 h→Paraplast 负压浸透 30 min→Paraplast 浸蜡 1 h→包埋。包埋完将蜡置于常温待凝固后，保存于干燥处。

1.2.4　免疫组织化学试验：病毒抗原以碱磷酶两步法进行检测。经预试验摸索，这种方法适于布安氏液固定的整个蚊虫连续石蜡切片染色。制备 7 μm 的连续石蜡切片，每只蚊虫切片尽量展在同一张玻片上。阳性及阴性对照切片的染色按同样方法进行。在碱磷酶两步法的每一步，设阳性对照和阴性对照，分别略去一抗、酶标二抗以排除非特异结合。碱磷酶法处理蚊虫切片大致包括以下几步：（1）Hemo-de 脱蜡。Hemo-de Ⅰ，5 min；Hemo-de Ⅱ，2 min；（2）在梯度乙醇 100%Ⅱ，100%Ⅰ，95%，70%中各脱水 2 min，蒸馏水洗 5 min；（3）采用微波加热法修复抗原（用 0.01 mol/L pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液）95～98℃，作用 10 min；（4）以 2%正常山羊血清和 2%牛血清白蛋白（BSA）室温封闭 20～30 min；（5）以含 5%正常山羊血清的 PBS 1∶200 稀释一抗（抗登革 2 型病毒多抗或 HB-114 杂交瘤单抗）于 37℃作用 1 h；（6）以 1% BSA 的 PBS 液 1∶1 000 倍稀释二抗（碱磷酶标记羊抗鼠 IgG）于 37℃作用 30 min；（7）用 AP-Red 底物检测抗原；（8）用Mayer's 苏木精对比染色；（9）以蒸馏水洗；（10）甘油明胶封片。抗原阳性细胞或组织呈现红色沉积。

2　结果

通过 4 次重复试验，共切感染的白纹伊蚊 480 只、正常蚊 150 只。排除损坏的或处理不当的标本，对 426 只白纹伊蚊体内病毒的分布情况进行了详细的检测，以红色为阳性染色特征，阴性组织呈蓝紫色。蚊虫组织染色结果见表 1～3。通过对阴性对照及阳性对照标本的综合分析，排除以下几种非特异染色情况，如部分脱落、偶尔干涸的切片或污染的碎片，在处理过程中有损坏的标本，在分析时均予以排除。分析过程中发现马氏管、脂肪体的某些细胞及某些卵泡组织经常出现非特异染色，亦予以排除。最后对各次试验结果进行综合分析。感染及未感染病毒的蚊虫连续切片免疫组织化学染色结果分别见图版Ⅰ的 A～D（感染白纹伊蚊）和 E～F（未感染白纹伊蚊阴性对照）。

2.1　消化道和涎腺内 DEN-2 抗原的分布

表 1 概括了经口感染 DEN-2 后白纹伊蚊消化道内病毒抗原的分布情况。经口感染蚊虫个体前肠的感染率高于后肠。而中肠的感染率却高于两者。中肠组织的主要部分均被感染，感染后第 7 天，检测的 56 只蚊虫，98.2%的蚊虫中肠感染病毒，76.8%的前肠也检测到病毒，而后肠组织的感染率为 67.9%。而感染后第 12 至 14 天，检测的 140 只蚊虫中，则有 98.6%的中肠感染病毒。前肠与后肠的感染率则分别为 97.0%和 94.4%。后肠组织的染色深（图版 I：A），而前肠与中肠相接处的部位染色程度也较深。

表 1 亦描述了病毒在涎腺各部分的抗原分布。感染后第 7 天，56 只蚊虫中仅有 60.7%的涎腺近端感染病毒，而感染后第 12 至 14 天，144 只标本中有 95.8%的涎腺近端内可检测到病毒抗原，涎腺远端的感染率则为 54.4%。涎腺的三个叶均有抗原分布（图版 I：B），涎腺各叶近端染色程度最强，尤其是中叶近端染色程度最高，感染率也最

表 1 DEN-2 抗原在白纹伊蚊涎腺及消化道内的分布

Table 1 Distribution of dengue 2 virus in various sections of the salivary glands, alimentary canal of *Ae. albopictus*: percentage of specimens examined staining positive for dengue viral antigen

观察标本数（只）Number of specimens examined	感染后时间（天）Days after infection	涎腺及消化道内 DEN-2 抗原分布（%）Percentage staining positive for dengue viral antigen in salivary glands and alimentary canal				
		涎腺近端 Salivary glands (proximal)	涎腺远端 Salivary glands (distal)	前肠 Forgut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
40	2	0	0	0	0	0
60	3	3.3	0	5	20	0
58	5	12.1	3.4	48.3	74.1	32.8
56	7	60.7	39.1	76.8	98.2	67.9
72	9	83.3	41.7	87.5	95.8	86.1
72	12	94.4	51.4	95.8	98.6	93.1
68	14	97.1	57.4	98.5	98.5	95.6

表 2 DEN-2 抗原在白纹伊蚊神经系统组织内的分布

Table 2 Distribution of dengue 2 virus in various sections of the nervous system of *Ae. albopictus*: percentage of specimens examined staining positive for dengue viral antigen

观察标本数（只）Number of specimens examined	感染后时间（天）Days after infection	神经系统内 DEN-2 抗原的分布 Percentage staining positive for dengue viral antigen in nervous system				
		脑及食管下神经节 Brain and suboes-phageal ganglion	咽神经节 Thoracic ganglion	腹神经节 Abdominal ganglion	复眼的小眼 Ommatidia	Johnston 器官 Johnston's organ
40	2	0	0	0	0	0
60	3	1.7	0	0	0	0
58	5	25.9	19.0	17.2	15.5	8.6
56	7	58.9	55.4	32.1	46.4	32.1
72	9	81.9	81.9	40.3	56.9	62.5
72	12	93.1	90.3	70.8	73.6	66.7
68	14	94.1	89.7	82.4	86.8	80.9

表 3 DEN-2 抗原在白纹伊蚊生殖系统组织内的分布

Table 3 Distribution of dengue 2 virus in various sections of female reproductive tissues of *Ae. albopictus*: percentage of specimens examined staining positive for dengue viral antigen

观察标本数（只）Number of specimens examined	感染后时间（天）Days after infection	生殖系统内 DEN-2 抗原分布（%）Percentage staining positive for dengue viral antigen in female reproductive tissues		
		卵母细胞 Oocytes/nurse cells	滤泡上皮细胞 Follicular epithelium	输卵管 Oviduct
40	2	0	0	0
60	3	0	0	0
58	5	0	0	0
56	7	0	0	0
72	9	2.8	6.9	4.2
72	12	6.9	13.9	12.5
68	14	13.2	13.2	11.8

高；侧叶的远端则染色较低或没有阳性染色。

2.2　神经系统内 DEN-2 抗原的分布

表 2 概括了中央神经系统、神经节等组织内抗原的分布情况。感染后第 5 天脑部、食管下神经节、咽部神经节内均可检测到病毒抗原，感染后第 9 天头胸部神经系统及腹部神经节的感染率增高，染色增强，脑部及食管下神经节的感染率最高可达 94.1%。腹神经节的感染率较咽部神经节低，感染后第 12 天，感染率分别为 70.8%和 90.3%。头胸部及腹神经节组织内的抗原分布没有明显差别，神经节内抗原多分布在鞘膜和细胞体。

蚊虫复眼的小眼及 Johnston 器官作为感觉器官也作了检测。蚊虫复眼的小眼及 Johnston 器官内也可检测到抗原，感染后第 9 至 14 天这两种组织的平均感染率分别为 72.4%和 70%。

2.3　生殖系统内 DEN-2 抗原的分布

表 3 展示了抗原在雌性白纹伊蚊生殖系统内的分布。某些蚊虫卵巢鞘膜、卵巢管鞘膜、输卵管萼及输卵管呈抗原阳性，有些滤泡上皮、卵母细胞和滋养细胞也有抗原零星分布，但因这些部位经常出现非特异染色，致使结果很难判断。

3　讨论

对 DEN-2 经口感染白纹伊蚊后病毒侵染其中肠并散播到其他组织的过程进行的免疫组织化学研究，从组织水平反映了病毒感染中肠、涎腺等主要组织的特点与分布规律，以下将从几方面分别阐述。

3.1　消化道组织内病毒抗原分布

本研究中，白纹伊蚊中肠主要部位均被感染。感染后不同时间，病毒逸出中肠进入血淋巴，继而侵染相关组织。从病毒侵染中肠外组织的时间与程度可看出，一旦病毒从肠腔逃逸，会很快传播到其他组织。除中肠普遍感染病毒外，前肠与后肠的感染率亦较高。Clay 等（1972）曾指出，蚊虫前肠及后肠内有一层非细胞的几丁化的内膜，即便是水也无法渗透过去，因此病毒不能穿过内膜由肠腔进入前肠和后肠。白纹伊蚊前肠及后肠的感染提示病毒是从中肠内散播的。经口感染蚊虫的前肠感染率比后肠的高，部分因为这些区域的上皮细胞靠近血淋巴一侧的底膜厚度不一。前肠的感染率高，也使得这一组织及相接的组织成为病毒离开中肠后迅速增殖的部位，这与由中肠释放的病毒通过中肠至前肠这一途径引发散播感染的推论一致。本试验中前肠的感染率高于其它组织，是中肠外最先感染或病毒复制的组织。而脑及食管下神经节、咽部神经节、涎腺的感染率也较高，这些组织感染顺序相近。这与病毒一旦离开中肠，会很快感染其它组织的结论一致。

3.2　涎腺组织内病毒抗原分布

DEN-2 越过中肠后，除前肠外会迅速侵染涎腺组织。涎腺感染是病毒被生物传播过程中最重要的器官。Linthicum 等（1996）对埃及伊蚊经胸接种 DEN-3 病毒的研究表明，14 天内涎腺侧叶近端的感染率最高，中叶远端的感染率最低。而接种 16 天后，侧叶远端有很高的感染率。Sriurairatna 等（1977）对白纹伊蚊涎腺内 DEN-2 分布的电镜观察表明，经胸接种 16 天后，病毒多集中于涎腺泡细胞内，也就是侧叶远端内。本试验中，感染 DEN-2 白纹伊蚊的整个涎腺均有病毒感染，但在涎腺中叶近端最早观察到病毒抗原，之后逐渐在涎腺侧叶近端和远端区域检测到该抗原。根据 14 天内涎腺各部分感染率的高低推断，涎腺近端尤其是中叶近端感染率最高，侧叶和中叶远端感染率较低。以上报道的涎腺各叶感染时间和感染程度的差别可能与蚊虫感染方式或感染时间长短有关。本试验仅检测了经口感染 14 天内涎腺的感染情况，随着潜伏期的延长，涎腺各叶的感染程度可能会发生改变，或者接种感染与经口感染后，组织感染的顺序与程度会存在一定差别，仍有待于进一步观察。

本试验中有两个标本的涎腺在吸血感染 72 h 内已被病毒感染。Romosor 等（1992）在对尖音库蚊经口感染 RVF 病毒的研究表明，在吸血感染 24 h 内有的标本已具散播感染。Scott 等（1984）通过电镜研究观察到，东部马脑炎（eastern equine encephalitis，EEE）病毒感染黑尾脉毛蚊 *Culiseta melanura* 后 55 ~ 59 h，在其涎腺内即可繁殖。很明显，如此早或如此迅速的散播方式并非罕见，但其机制至今尚不清楚。可能 DEN-2 会通过某种快速方式越过中肠而引发散播感染，或者直接越过中肠内有损坏的部位进入血淋巴再感染涎腺。若病毒通过某种快速方式越过中肠迅速散播并侵染涎腺，蚊虫感染后可能很快就可传播病毒。

3.3　神经系统各组织内 DEN-2 抗原的分布

神经系统是 DEN-2 较早并广泛感染的器官。DEN-2 首先感染脑、食管下神经节、咽部神经节，然后开始侵染复眼的小眼及 Johnston 器官。病毒还

可通过腹神经索传至腹神经节。有研究已证实白纹伊蚊涎腺感染 DEN-2 是由内部神经感染引起的（Leake and Johnson，1987）。后肠的感染也可能由神经感染引起，因在后肠周围的脂肪细胞内未检测到病毒，而神经系统感染病毒的时间较早，感染程度也高。

3.4 雌性生殖系统及其他组织内 DEN-2 抗原分布

个别白纹伊蚊输卵管萼、滤泡上皮细胞和个别卵母细胞也有抗原分布，但因卵巢有些组织容易出现非特异着色，致使结果难以判定。但 Romoser 等（1992）在一些经口感染的尖音库蚊卵巢及卵泡鞘膜中也发现 RVF 病毒，而经胸接种的蚊虫内则没有，推断这些鞘膜的感染与蚊虫血餐引起的变化有关。其它研究证实，有些蚊虫生殖系统不同部位的上皮细胞（如阴道、侧输卵管、中输卵管、生殖腔等）也被病毒感染。如果病毒被释放入这些生殖管腔内，会感染卵表面组织或通过卵孔进入卵内，提示 DEN-2 很有可能会通过白纹伊蚊经卵传递，这是值得重视的问题。

从以上论述可知，DEN-2 进入白纹伊蚊肠腔后，首先在很短时间内引发中肠上皮细胞感染，大量复制后进入血淋巴的病毒会很快侵染前肠、涎腺等组织，这样一旦蚊虫再次吸血，DEN-2 便会通过涎腺传播给新的宿主，使得白纹伊蚊成为 DEN-2 的有效媒介。各组织的易感顺序通常为：中肠、前肠、涎腺、脑及食管下神经节、咽部神经节、后肠及复眼的小眼等。而 DEN-2 在白纹伊蚊体内组织的广泛分布，在某种程度上可能会影响蚊虫的生存率以及生殖能力。已有报道表明，某些虫媒病毒感染蚊虫后可造成中肠上皮细胞及涎腺体的病理性影响。尤其是中央神经系统的神经节，脑部的神经分泌细胞以及感觉器官的广泛感染，很可能会影响蚊虫的行为功能，或终因能源的枯竭而死亡，这值得深入研究。

参 考 文 献 （References）

Clay M E，Venard C E，1972. The fine structure of the oesophageal diverticula in the mosquito，*Aedes triseriatus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*，65：964～975.

Faran M E，Romoser W S，Routier R G *et al.*，1987. Use of the avidin-biotin-peroxidase complex immunocytochemical procedure for detection of Rift Valley fever virus in paraffin sections of mosquitoes. *Am. J. Tro. Med. Hyg.*，37（2）：403～409.

Grimstad P R，1983. Mosquitoes and the incidence of encephalitis. *Adv. Virus. Res.*，28：357～438.

Hardy J L，1988. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In：Monath T P ed. The Arbovirus：Epidemiology and Ecology. Vol. I. Boca Raton，FL：CRC Press. 87～126.

Hardy J L，Houk E J，Kramer L D *et al.*，1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arbovirus. *Annu. Rev. Entomol.*，28：229～262.

Kuberski T，1979. Fluorescent antibody studies on the development of dengue-2 virus in *Aedes albopictus*（Diptera：Clicidae）. *J. Med. Entomol.*，16（4）：343～349.

Leake C J，Johnson R T，1987. The pathogenesis of Japanese encephalitis virus in *Culex tritaeniorhynshus* mosquitoes. *Transact. Roy. Soci. Trop. Med. Hyg.*，81（4）：681～685.

Linthicum K J，Platt K，Myint K S *et al.*，1996. Dengue 3 virus distribution in the mosquito *Aedes aegypti*：an immunocytochemical study. *Med. Vet. Entomol.*，10（1）：87～92.

Romoser W S，Faran M E，Bailey C L *et al.*，1992. An immunocytochemical study of the distribution of Rift Valley fever virus in the mosquito *Culex pipens*. *Am. J. Tro. Med. Hyg.*，46（4）：489～501.

Scott T W，Hildreth S W，Beaty B J，1984. The distribution and development of eastern equine encephalitis virus in the enzootic mosquito vector，*Culiseta melanura*. *Am. J. Tro. Med. Hyg.*，33（5）：300～310.

Sriurairatna S，Bhamarapravati N，1977. Replication of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* mosquitoes：an electron microscopic study. *Am. J. Tro. Med. Hyg.*，26（6 pt 1）：1 199～1 205.

图 版 说 明（Explanation of Plate）

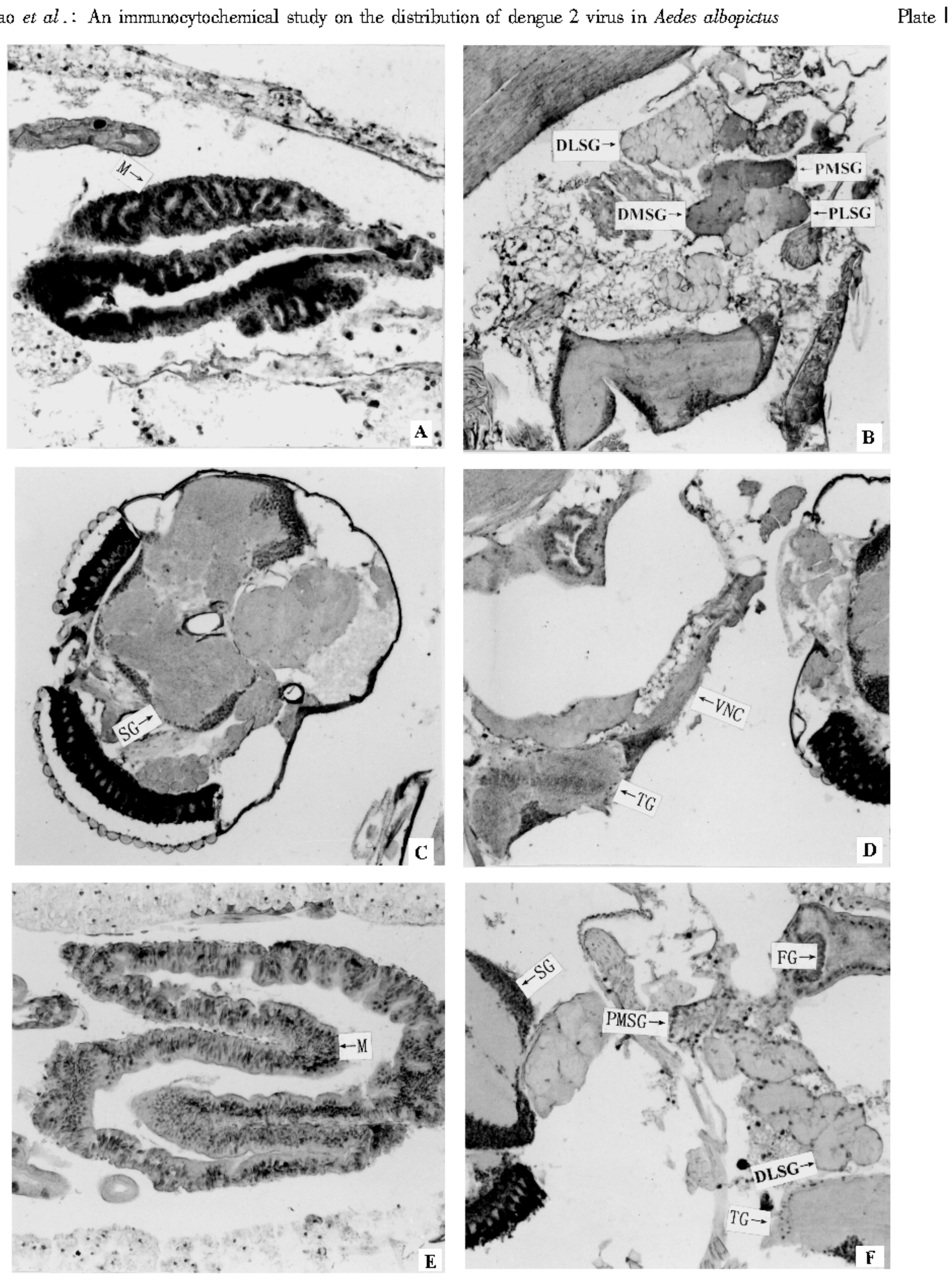
图版Ⅰ（Plate Ⅰ）

感染 DEN-2（A～D）和对照（E～F）白纹伊蚊雌蚊连续石蜡切片免疫组织化学染色

Immunocytochemical preparations of sagital sections of female adult *Aedes albopictus* infected with dengue 2 virus（A～D）and control（E～F）

A. 消化道 alimentary canal（300×）；B. 涎腺 salivary glands（300×）；C. 神经组织 ganglions（300×）；D. 神经组织 ganglions（300×）；E. 消化道 alimentary canal（×300）；F. 头胸部神经及涎腺组织 ganglions and salivary glands（300×）

M：中肠 midgut；SG：食管下神经节 suboesophageal ganglion；TG：咽部神经节 thoracic ganglion；PMSG：中叶近端 proximal portion of median lobe；PLSG：侧叶近端 proximal portion of lateral lobe；DMSG：中叶远端 distal portion of medianlobe；DLSG：侧叶远端 distal portion of lateral lobe；PMSG：涎腺中叶近端 proximal portion of median lobe；PLSG：涎腺侧叶近端 proximal portion of lateral lobe；DMSG：涎腺中叶远端 distal portion of median lobe；DLSG：涎腺侧叶远端 distal portion of lateral lobe



图版说明见文后（Explanation at the end of the text）